

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representation of
The original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

⑩ 日本国特許庁(JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A)

平4-184163

⑬ Int. Cl.⁵ 識別記号 庁内整理番号 ⑭ 公開 平成4年(1992)7月1日

G 01 N 27/447
C 25 B 7/00
// C 09 K 3/00 1 0 3 B 9046-4K
9049-4H
7235-2J G 01 N 27/26 3 1 5 F
審査請求 未請求 請求項の数 6 (全8頁)

⑮ 発明の名称 電気泳動用ポリアクリルアミドゲルの製造方法

⑯ 特 願 平2-311406

⑰ 出 願 平2(1990)11月19日

⑱ 発 明 者 武 田 久 雄 神奈川県座間市入谷4-2923-26
⑱ 発 明 者 越 路 祐 一 神奈川県高座郡寒川町4丁目15番14
⑱ 発 明 者 久 保 田 英 博 東京都文京区本郷7丁目2番3号 アトー株式会社内
⑱ 発 明 者 飯 塚 高 史 東京都文京区本郷7丁目2番3号 アトー株式会社内
⑰ 出 願 人 ハイモ株式会社 東京都中央区銀座7丁目13番15号
⑰ 出 願 人 アトー株式会社 東京都文京区本郷7丁目2番3号
⑲ 代 理 人 弁理士 尾 仲 一 宗

明 細 書

1. 発明の名称

電気泳動用ポリアクリルアミドゲルの製造方法

2. 特許請求の範囲

(1) 泳動用電極液の組成がトリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン及び両性電解質を含有する水溶液である電気泳動法に用いるポリアクリルアミドゲルを製造するに当たり、ゲル緩衝液の組成がトリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン、両性電解質及び酸を含有する水溶液であり、トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタンと酸の含有量比が1:0.6~1グラム当量部であること並びに酸と両性電解質の含有量比が1:0.5~4グラム当量部であることを特徴とする電気泳動用ポリアクリルアミドゲルの製造方法。

(2) 両性電解質pK。値が7~11の範囲にあることを特徴とする請求項1に記載の電気泳動用ポリアクリルアミドゲルの製造方法。

(3) 酸のpK。値が5以下であることを特徴とする請求項1に記載の電気泳動用ポリアクリル

アミドゲルの製造方法。

(4) ゲル緩衝液のpHが4.0~7.5の範囲にあることを特徴とする請求項1に記載の電気泳動用ポリアクリルアミドゲルの製造方法。

(5) 泳動用電極液中にドデシル硫酸塩が存在することを特徴とする請求項1に記載の電気泳動用ポリアクリルアミドゲルの製造方法。

(6) アクリルアミドを、架橋剤、水、ゲル緩衝液、重合開始手段の存在下に重合させて電気泳動用ポリアクリルアミドゲルを製造するに当たり、該ゲル緩衝液の組成がトリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン、両性電解質及び酸を含有する水溶液であり、トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタンと酸の含有量比が1:0.6~1グラム当量部であること並びに酸と両性電解質の含有量比が1:0.5~4グラム当量部であることを特徴とする請求項1に記載の電気泳動用ポリアクリルアミドゲルの製造方法。

3. 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

この発明は、生化学、医学の分野において、生体由来物質、例えば、蛋白質、核酸等の分離分析に用いられる電気泳動用ポリアクリルアミドゲルの製造方法に関する。

〔従来の技術〕

従来、電気泳動用の支持体として紙、アガロース、澱粉等が用いられていたが、それらは分離能が悪く、バンドも不鮮明であった。

近年、ポリアクリルアミドを支持体とするゲル電気泳動法が確立され、高い精度の分子ふるい効果により高分解能が期待できるようになった。

中でも泳動用ゲルとして、緩衝液を内包したポリアクリルアミド架橋物を用いる方法は、アクリルアミド濃度と架橋剤の組成により、ゲルのポアサイズを任意に調節できることから現在のゲル電気泳動法における主流となっており、分離しようとする蛋白質、核酸等の分子量によりアクリルアミド濃度を換えたゲルを作り分析に用いている。即ち、一般に、比較的低分子量の蛋白質、核酸の分離には高濃度のポリアクリルアミドゲルが高分

子量の蛋白質、核酸の分離には低濃度のポリアクリルアミドゲルが用いられている。

これらの技術に関して、例えば、特開昭63-502456号公報、特開昭62-91850号公報、特開平2-22555号公報等がある。

即ち、特開昭63-502456号公報には、電気泳動分離法に対する緩衝溶液の供給方法が開示されている。該電気泳動分離法に対する緩衝溶液の供給方法は、通常は液状で使用される電極液をゲル状とし、分離用ゲルとの接触を容易にしたものであり、ゲル板の形態の支持マトリックスで行われる水平電気泳動分離法に緩衝剤溶液を供給するものであり、2種の電極緩衝剤をそれぞれ1つのゲル片に混入し、これらゲル片をゲル片間のマトリックスが使用可能な分離領域を提供するように支持マトリックスと接触させておくものである。また、ゲル片がアガロース若しくはポリアクリルアミドよりなるものである。更に、各ゲル片における電極緩衝剤の含有量が80～99重量%の範囲内であるものである。

また、特開昭62-91850号公報には、ポリアクリルアミド系水性ゲル電気泳動用媒体の製造方法が開示されている。該電気泳動用媒体の製造方法は、アクリルアミド系単量体、架橋剤、水及び重合開始手段の存在下に架橋重合させるに当たり、該重合開始手段が過酸化物、光増感剤、及び励起光の組み合わせからなり還元剤を含まない方法である。

また、特開平2-22555号公報には、電気泳動ゲル媒体用キットが開示されている。該電気泳動ゲル媒体用キットは、ポリアクリルアミド型ポリマーゲル媒体を便利に安全に形成するためのキットである。

また、広範囲の分子量分布を有する蛋白質や核酸を分離するため、泳動方向に対してアクリルアミド濃度を連続的に変化させたグラジエントゲルに関する技術として、例えば、特開昭61-28512号公報、特開昭63-210654号公報、特開平1-263548号公報などがある。

即ち、特開昭61-28512号公報には、電

気泳動ゲル物質の製法が開示されている。該電気泳動ゲル物質の製法は、重合を水溶性の有機光反応開始剤を使用する均一系光重合、或いは光重合水溶液中に有機反応開始剤を懸濁又は分散させた不均一系光重合により開始して、連続的な孔勾配を有するグラジエントゲルの製法である。

特開昭63-210654号公報、及び特開平1-263548号公報には、電気泳動用媒体について開示されている。即ち、これら公報には、低分子量部分から高分子量部分までほぼ同等な良好な高分離性能を持つ、改良されたポリアクリルアミド系水性ゲル濃度グラジエントを有するゲル媒体が記載されている。

また、アクリルアミド濃度を段階的に変化させた電気泳動用ゲルを製造する技術として、特開平1-302153号公報がある。即ち、アクリルアミド濃度の異なる複数のモノマー水溶液を段階的に逐次重層し、次いで、これを重合して得られる電気泳動用ゲルの製造方法が記載されている。

前記の公知技術において、ゲルを構成するアク

リルアミド濃度の実用的な範囲は、4～20重量%であり、4重量%以下の低濃度ではゲル強度が小さく、20重量%以上の高濃度では容器面との間に剥離を生じ易い。

また、蛋白質をドデシル硫酸ナトリウム（以下、SDSと略す。）で処理し、蛋白質分子の電荷を均等にしてゲル電気泳動を行えば、分子量差のみによって分離が行われ、特に、ゲル緩衝液として、トリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン（以下、トリスと略す。）の塩酸による部分中和物を使用し、泳動用電極液として、トリス・グリシン塩を使用する方法は、レムリー（U.R. Laemmli, Nature Vol. 227, 680 (1970)）の処方として蛋白質の分析に實用されている。このレムリーの処方におけるゲル緩衝液では、pHが8.8となるように、トリスの約10～20モル%を塩酸により部分中和している。

（発明が解決しようとする課題）

前述したようにレムリーの処方においては、ポリアクリルアミドゲルの内包する緩衝液のpH

は8.8であり、アミド基は経時的に加水分解反応を受ける。加水分解反応は、冷蔵庫保管のごとき低温条件下でも進行し、ポリアクリルアミドゲルは部分的にアニオン基を有することになる。この結果、蛋白質の泳動距離が短くなると共に、分離像は不鮮明となる。加水分解を防止するためにトリスの中和率を高め、ゲル緩衝液のpHを中性付近、あるいはそれ以下にすると、蛋白質の分子量差による分離性能が悪化し実用に堪えないものとなる。

また、前述したように実用的なゲル作成範囲であるアクリルアミド濃度4～20%のポリアクリルアミドゲルでは測定対象である蛋白質の分子量範囲も限定され、レムリーの緩衝液を用いた場合、アクリルアミド濃度4%のゲルで分子量50万、アクリルアミド濃度20%のゲルで分子量2万の蛋白質分子を分離するのが限界であり、測定可能な分子量範囲をさらに広範囲に拡大することが求められている。

この発明の目的は、上記の課題を解決するもの

であり、長期保存安定性に優れ、且つ測定可能な分子量範囲を著しく拡大した電気泳動用ポリアクリルアミドゲルの製造方法を提供することである。（課題を解決するための手段）

この発明は、上記の目的を達成するため、次のように構成されている。即ち、この発明は、泳動用電極液の組成がトリス及び両性電解質を含有する水溶液である電気泳動法に用いるポリアクリルアミドゲルを製造するに当たり、ゲル緩衝液の組成がトリス、両性電解質及び酸を含有する水溶液であり、トリスと酸の含有量比が1：0.6～1グラム当量部であること並びに酸と両性電解質の含有量比が1：0.5～4グラム当量部であることを特徴とする電気泳動用ポリアクリルアミドゲルの製造方法に関する。

また、この電気泳動用ポリアクリルアミドゲルの製造方法において、両性電解質のpK_a値は7～11の範囲である。

また、この電気泳動用ポリアクリルアミドゲルの製造方法において、酸のpK_a値は5以下であ

る。

更に、この電気泳動用ポリアクリルアミドゲルの製造方法において、ゲル緩衝液のpK_a値は、4.0～7.5である。

また、この電気泳動用ポリアクリルアミドゲルは、その使用時において、泳動用電極液中にSDSを含有するものである。

また、この発明は、アクリルアミドを、架橋剤、水、ゲル緩衝液、重合開始手段の存在下に重合させて電気泳動用ポリアクリルアミドゲルを製造するに当たり、該ゲル緩衝液の組成がトリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン、両性電解質及び酸を含有する水溶液であり、トリス（ヒドロキシメチル）アミノメタンと酸の含有量比が1：0.6～1グラム当量部であること並びに酸と両性電解質の含有量比が1：0.5～4グラム当量部であることを特徴とする電気泳動用ポリアクリルアミドゲルの製造方法に関する。

この電気泳動用ポリアクリルアミドゲルの製造方法において、ゲル緩衝液を構成する酸は、少量

の添加でゲル緩衝液のpHをアミド基の加水分解が起こらない範囲にまで低下させるので、解離定数の大きいことが望まれ、pK_a値が5以下であることが望ましい。特に、好ましい酸は塩酸、一面の水溶性有機酸である。

また、この発明に用いる両性電解質は、分子内にアニオン性基とカチオン性基を同数有するものであり、pK_a値よりやや低いpHでは全てのアニオン性基と全てのカチオン性基が解離し電氣的に中性となり、pK_a値より高いpHではアニオン性基のみが解離しカチオン性基の解離が抑制されるため、負に帯電する。

このために、上記両性電解質は、実質的に一面の弱酸としての挙動を示すものであり、上記含有量に表示するグラム当量部は、一面の弱酸として計算する。pK_a値は通常20℃において測定され、pK_a値が1以上の両性電解質は電位勾配の低下に寄与せず、7以下の場合にはリーディングイオン（ゲル緩衝液中に存在するpK_a5以下の酸根）とともに流出してしまう。

分子量範囲を拡大することができる。

この発明による電気泳動用ポリアクリルアミドゲルは、ゲル緩衝液のpH調整と両性電解質の添加以外は、従来公知の常法に従って製造することができる。例えば、架橋を目的とした水溶性ジビニル化合物としては、N,N'-メチレンビスアクリルアミド（以下、BISと略す。）が最も多用されているが、その他、N,N'-ジアルキル酒石酸アミド等の一般的なジビニル化合物も使用することができる。

モノマー水溶液には、ゲルに弾力性を持たせ、脆弱さを改善するため、アガロース、ポリアクリルアミド、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、ポリエチレンオキシド、ポリメチルビニルエーテル等の水溶性ポリマーを含有させることもできる。他のモノマーを共重合することもできる。

モノマーの重合は、重合開始剤や紫外線照射により発生するラジカルによって行われる。重合開始剤としては、過硫酸アンモニウム（以下、APSと略す。）等の過酸化剤とN,N,N',N'-テトラメチルエチレンジアミン（以下、TEMEDと略す。）等の還元剤を併用するレッドックス型の重合開始剤が実用されるが、これらに特に限定されるものではない。上記過酸化剤及び還元剤は、全モノマーに対し、0.05～5%（W/V）が使用される。また、重合温度は開始剤が機能する温度であれば特に限定されないが、通常15～50℃の範囲が好ましい。

この発明に用いられる両性電解質として、グリシン、セリン、アスパラギン、β-アラニン、N-トリス（ヒドロキシメチル）メチル-3-アミノプロパンスルホン酸（以下、TAPSと略す。）、N-トリス（ヒドロキシメチル）メチルグリシン（以下、トリシンと略す。）、N-トリス（ヒドロキシメチル）メチル-2-アミノエタンスルホン酸（以下、TESと略す。）等がある。

ゲル緩衝液を構成する両性電解質のpK_a値は、陰極側の泳動用電極液を構成する両性電解質のpK_a値より高くしてはならない。電位勾配の低下に寄与する両性電解質は、泳動用電極液からゲル中に移動してくる両性電解質（トレイリングイオン）と同一又は低いpK_a値を持つ必要がある。ゲル緩衝液を構成する両性電解質は、目的に応じて1種又は2種以上を使用することができる。複数種の両性電解質を併用した場合は、pK_a値の低いものから順に逐次陽極側へ移動し、ゲル内の電位勾配の変化は緩やかなものとなり、アクリルアミド濃度を変化させた場合と同様に測定対象の

Sと略す。）等の過酸化剤とN,N,N',N'-テトラメチルエチレンジアミン（以下、TEMEDと略す。）等の還元剤を併用するレッドックス型の重合開始剤が実用されるが、これらに特に限定されるものではない。上記過酸化剤及び還元剤は、全モノマーに対し、0.05～5%（W/V）が使用される。また、重合温度は開始剤が機能する温度であれば特に限定されないが、通常15～50℃の範囲が好ましい。

〔作用〕

この発明による電気泳動用ポリアクリルアミドゲルの製造方法は、上記のように構成されており、次のように作用する。

通電によりアニオンは陽極側へと移動する。即ち、陰極側電極液中のアニオンは、ゲル中へ移動し、ゲル中のアニオンは陽極側電極液中へ移動する。

前述のレムリーの処方のように、ゲル緩衝液として強酸塩水溶液を用い、電極液として弱酸塩水溶液を用いる電気泳動法の場合、ゲル中の強酸根

は陽極側へ移動し、陰極側電極液中の弱酸根はゲル中へ移動する。ゲル緩衝液と電極液に共通のカチオンとして、トリスのような弱塩基を用いた場合は、弱酸根の一部が電荷を失いイオン量が減少することにより、ゲル中の電気抵抗（即ち、電位勾配）が上昇し分離対象である蛋白質分子等の泳動速度が高まる。

そして、泳動ゲル中のトリス強酸塩部分とトリス弱酸塩部分は明瞭に区分され、境界付近での電位勾配の変化は強酸によりトリスの中和率が高まるほど大きくなる。このため、高中和率の場合は境界付近に分離対象が収斂し易くなり、特に、低分子量分画部の分離特性が悪くなる。これを防止するためには、ゲル中における弱酸塩部分の電気抵抗値を適度に低下させる必要がある。

この発明のごとく予めゲル緩衝液中に弱酸を添加しておくことにより、弱酸塩部分のイオン量が増加し電気抵抗値は低下する。電気抵抗値は弱酸のpK_a値と濃度により任意に変えることができる。しかも、強酸根の存在下ではpHが低いため

に弱酸は電気的に中性であり、電気抵抗値を下げることは無い。

しかしながら、これら電気抵抗値を調節する目的に適した弱酸のpK_a値は、7～11であり、通常のアニオン性基の解離定数とはかけ離れた値である。

このため、この発明においては、カチオン性基とアニオン性基を同数有する両性電解質を擬似弱酸として用い、カチオン性基のpK_a値を上記範囲とすることにより、アルカリ側ではカチオン性基の解離が抑制され、アニオンとしての挙動を示し、酸性側においては同数のアニオン性基とカチオン性基が解離するため、電気的に中性であり、電気伝導に寄与しない。

このように適当なpK_a値を有する両性電解質を予めゲル緩衝液中に適量共存させることにより、泳動中のゲル内の電位勾配の分布を調節することができる。そして、分子量が異なる種々の試料に対応して広範囲にわたり、高分解能の泳動像を得ることが可能になる。

また、この発明のようにゲル緩衝液中に両性電解質を共存させると泳動終了後の酸性染料による蛋白質の染色を助ける効果が認められる。これは、染色時の酢酸酸性下において両性電解質はアニオン性基の解離が抑制され、カチオンとして作用し、蛋白質分子と結合したアニオン物質の妨害作用を除去するものと推測される。

〔実施例〕

以下、この発明による電気泳動用ポリアクリルアミドゲルの製造方法の実施例について説明するが、この発明は、この出願の特許請求の範囲に記載された事項によって構成される技術的思想の範囲内を超えない限り、以下に説明する実施例に制約されるものでないことは勿論である。

実施例-1

横幅 12 cm、縦 10 cm の長方形のガラス板と上部に凹状の切り込みの入った同寸法のガラス板の間に、厚さ 1 mm のスペーサを挟んでガラスプレートを組み立てる。アクリルアミド濃度 12.5 % (w/v)、BIS濃度 2.6 % (w/v)、並びに変

-1 に記載する濃度の緩衝液組成から成るモノマー溶液に対し、APS 400 ppm およびTEMED 400 ppm を添加混合後、プレート内に注入し、常法で重合させ、電気泳動用ポリアクリルアミドゲルを得た。

該ポリアクリルアミドゲルを用いて分子量既知の市販マーカー蛋白質を電気泳動し、移動距離を測定した。

マーカー蛋白質は、βメルカプトエタノール、SDSを用いて処理し、7%グリセリン及び0.05%ブロムフェノールブルー（以下、BPBと略す。）を加えて試験に供した。

泳動用電極液の組成は、トリス濃度0.025 mol/l、グリシン濃度 0.192 mol/l、SDS 0.1重量%のレムリー処方である。

電気泳動は、20 mA 定電流で行い、BPBの泳動末端が下から5 mmの所で通電を中止した。

染色は、0.25%クマシーブリリアントブルー（以下、CBBと略す。）-G250、10%酢酸、30%メタノール溶液中で2時間行なった。また、

脱色は、7%酢酸、3%メタノール溶液で適宜新しい溶液に替えながら一昼夜行った。

B P B泳動距離に対する各蛋白の泳動距離の比を移動度として表-2及び表-3に記載する。

表-2は製造直後の移動度であり、また、表-3は5℃で120日間保存後の移動度である。

表-1 泳動ゲル緩衝液組成

| | 試料-1 | 試料-2 | 比較試料-1 | 比較試料-2 |
|-----------------|-------|-------|--------|--------|
| トリス (mol/l) | 0.094 | 0.094 | 0.094 | 0.375 |
| 塩酸 (mol/l) | 0.080 | 0.080 | 0.080 | 0.060 |
| グリシン (mol/l) | 0.190 | 0.190 | — | — |
| SDS (重量%) | — | 0.1 | 0.1 | 0.1 |
| pH | 7.3 | 7.3 | 7.3 | 8.8 |

上記の表における試料-1及び試料-2の単位は、mol/lで表されており、ここでグリシンの酸(塩素イオン)に対する比(グラム当量比)は、

$$0.080 : 0.19 = 1 : 2.4$$

実施例-2

実施例-1と同様のガラスプレートを用い、表-4に記載する濃度の緩衝液組成から成るモノマー組成でポリアクリルアミドゲルを製造し、実施例-1と同一の条件で電気泳動を行った結果を表-5に示す。ただしBIS濃度は全て5.0%(%)C)である。

(以下、この頁余白)

である。

表-2 移動度(製造直後)

| | 試料-1 | 試料-2 | 比較試料-1 | 比較試料-2 |
|-----------------------------|------|------|--------|--------|
| 蛋白質分子量 6.7×10^4 | 0.09 | 0.09 | 0.15 | 0.09 |
| 蛋白質分子量 3.0×10^4 | 0.35 | 0.35 | 0.48 | 0.36 |
| 蛋白質分子量 1.4×10^4 | 0.72 | 0.72 | 0.97 | 0.74 |

表-3 移動度(5℃、120日間保存後)

| | 試料-1 | 試料-2 | 比較試料-1 | 比較試料-2 |
|-----------------------------|------|------|--------|--------|
| 蛋白質分子量 6.7×10^4 | 0.09 | 0.09 | 0.15 | 0.04 |
| 蛋白質分子量 3.0×10^4 | 0.35 | 0.35 | 0.48 | 0.11 |
| 蛋白質分子量 1.4×10^4 | 0.72 | 0.72 | 0.97 | 0.24 |

(以下、この頁余白)

表-4 泳動ゲル緩衝液組成

| | 試料-3 | 試料-4 | 比較試料-3 | 比較試料-4 |
|-----------------|----------------|-------|----------------|--------|
| ゲル濃度 (%T) | グラジエント 4-20 | 10 | グラジエント 4-20 | 10 |
| トリス (mol/l) | 0.094 | 0.094 | 0.375 | 0.094 |
| 塩酸 (mol/l) | 0.086 | 0.086 | 0.060 | 0.086 |
| グリシン (mol/l) | 0.190 | 0.048 | — | — |
| セリン (mol/l) | — | 0.048 | — | — |
| TAPS (mol/l) | — | 0.048 | — | — |
| トリシン (mol/l) | — | 0.048 | — | — |
| SDS (重量%) | 0.1 | 0.1 | 0.1 | 0.1 |
| pH | 7.0 | 7.1 | 8.8 | 7.0 |

(以下、この頁余白)

表-5 移動度

| | 試料-3 | 試料-4 | 比較 試料-3 | 比較 試料-4 |
|-----------------------------|------|------|------------|------------|
| 蛋白質分子量 9.4×10^4 | 0.17 | 0.17 | 0.17 | 0.25 |
| 蛋白質分子量 6.7×10^4 | 0.25 | 0.26 | 0.25 | 0.38 |
| 蛋白質分子量 4.3×10^4 | 0.35 | 0.35 | 0.35 | 0.65 |
| 蛋白質分子量 3.0×10^4 | 0.52 | 0.53 | 0.52 | 0.83 |
| 蛋白質分子量 2.0×10^4 | 0.69 | 0.72 | 0.70 | 0.96 |
| 蛋白質分子量 1.4×10^4 | 0.80 | 0.84 | 0.80 | 0.96 |

実施例-3

実施例-1と同様のガラスプレートを用い、表-6に記載する濃度の緩衝液組成から成るモノマー組成でポリアクリルアミドゲルを製造し、低分子量の試料の分離を試みた。ただしBIS濃度は全て5.0% (w/v) である。

分子量マーカーとしては、ファルマシア社製のポリペプチドを用いた。SDSおよびBメルカプ

トエタノールを、それぞれ2.5%、5%溶解した50mMトリス-塩酸緩衝液 (pH 6.8) にマーカーを溶解し、0.01%のCBBを加えて、室温で一晩放置した後、試験に供した。

泳動用電極液の組成はトリス濃度 0.025 mol/l、 β -SDS 0.1 重量%で、これに加える両性電解質を表-6の泳動用電極液の項に示す。

電気泳動は、20 mA 定電流で行い、CBBの泳動末端が下から 10 mm の所で通電を中止した。

電気泳動後、ゲルを50%メタノール、10%酢酸溶液で45分固定する。染色は、0.025% CBB-G250、10%酢酸溶液中で2時間行い、脱色は10%酢酸溶液で適宜新しい溶液に替えながら一晩行った。

CBB泳動距離に対する各蛋白質の泳動距離の比を移動度として表-7に記載する。

(以下、この頁余白)

表-6 泳動ゲル緩衝液組成

| | 試料-5 | 試料-6 | 試料-7 | 比較 試料-6 |
|-----------------------|--------------|---------------|---------------|---------------|
| ゲル濃度 (%T) | 15 | 15 | 15 | 15 |
| トリス (mol/l) | 0.100 | 0.100 | 0.100 | 0.100 |
| 中和酸 (mol/l) | 塩酸 0.082 | 塩酸 0.082 | 酢酸 0.092 | 塩酸 0.082 |
| グリシン (mol/l) | 0.048 | — | — | — |
| セリン (mol/l) | 0.048 | — | — | — |
| TAPS (mol/l) | 0.048 | — | — | — |
| トリシン (mol/l) | 0.048 | 0.100 | 0.100 | — |
| SDS (重量%) | 0.1 | 0.1 | 0.1 | 0.1 |
| pH | 7.4 | 7.3 | 6.9 | 7.3 |
| 泳動用 電極液 (mol/l) | TES 0.192 | トリシン 0.025 | トリシン 0.025 | トリシン 0.025 |

(以下、この頁余白)

表-7 移動度

| | 試料-5 | 試料-6 | 試料-7 | 比較 試料-6 |
|-----------------------------|------|------|------|------------|
| ポリペプチド 1.7×10^4 | 0.42 | 0.43 | 0.43 | 0.98 |
| ポリペプチド 8.2×10^3 | 0.54 | 0.58 | 0.58 | 0.98 |
| ポリペプチド 2.6×10^3 | 0.72 | 0.70 | 0.70 | 0.98 |

(発明の効果)

この発明による電気泳動用ポリアクリルアミドゲルの製造方法は、上記のように構成されており、次のような効果を有する。

実施例-1で示したように、ゲル緩衝液の酸によるトリスの中和率が低いレムリーの標準処方では高pHのために、長期保存により移動度が低下し分離能が悪くなる。一方、ゲル緩衝液の中和率を上げてpHを中性付近、或いはそれ以下にした場合は、長期保存による変質は無いが、レムリーの標準処方に比較して移動度が大幅に増大する。

これに対し、この発明による電気泳動用ポリ

クリルアミドゲルの製造方法のように、ゲル緩衝液に両性電解質を共存させた場合は、中和率を上げて変質を防止しても、レムリー標準処方に準じた泳動像が得られる。実施例1の試料-1と試料-2の比較から明らかなように、泳動用電極液中にSDSが存在すれば、ゲル緩衝液中の有無は泳動に影響を与えない。

また、実施例-2の試料-4は、アクリルアミド濃度10%の均一ゲルであるにもかかわらず、pK_a値の異なる複数の両性電解質を適宜ゲル中に共存させることにより、広範囲の分子量分布を持つ試料に対し良好な分離性能を示し、グラジエントゲルと類似の泳動像が得られる。

更に、実施例-3に示すように、従来困難であった2万以下の低分子量のポリペプチドもこの発明による電気泳動ゲルの場合は容易に分離することが可能である。

加えて、両性電解質の存在により泳動終了後の蛋白質の染色が助長される。

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載
【部門区分】第6部門第1区分
【発行日】平成6年(1994)11月25日

【公開番号】特開平4-184163
【公開日】平成4年(1992)7月1日
【年通号数】公開特許公報4-1842
【出願番号】特願平2-311406
【国際特許分類第5版】

G01N 27/447
C25B 7/00 8414-4K
// C09K 3/00 103 B 9155-4H
【F I】
G01N 27/26 315 F 7363-2J

手 続 補 正 書

(特許法第17条の2第1号の規定による補正)

平成6年6月16日

特許庁長官 麻 生 渡 殿

1. 事件の表示

平成2年特許願第311406号

2. 発明の名称

電気泳動用ポリアクリルアミドゲルの製造方法

3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

住 所 東京都中央区銀座7丁目13番15号

名 称 ハイモ株式会社

代表者 藤 村 欣 二 他1名

4. 代理人

Ⓔ116

住 所 東京都荒川区西日暮里5丁目18番11号

石川第1ビル 3階

氏 名 (9234) 弁護士 尾 仲 一 宗

電 話 (03) 3801-8421

5. 補正命令の日付(発送日) 自発

6. 補正の対象

(1) 明細書の特許請求の範囲

(2) 明細書の発明の詳細な説明の欄

7. 補正の内容

(1) 明細書の特許請求の範囲

別紙のとおり

(2) 明細書の発明の詳細な説明の欄

明細書第9頁第2行の「拡大した」と「電気泳動用」の間に「分離用ゲルであるところの」を挿入する。

明細書第9頁第8行の「用いる」と「ポリアクリル」の間に「分離用の」を挿入する。

明細書第21頁第5行の「条件で」と「電気泳動を」の間に「製造直後に」を挿入する。

2. 特許請求の範囲

(1) 泳動用電極液の組成がトリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン及び両性電解質を含有する水溶液である電気泳動法に用いる分離用のポリアクリルアミドゲルを製造するに当たり、ゲル緩衝液の組成がトリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン、両性電解質及び酸を含有する水溶液であり、トリス（ヒドロキシメチル）アミノメタンと酸の含有量比が1：0.6～1グラム当量部であること並びに酸と両性電解質の含有量比が1：0.5～4グラム当量部であることを特徴とする電気泳動用ポリアクリルアミドゲルの製造方法。

(2) 両性電解質pK_a値が7～11の範囲にあることを特徴とする請求項1に記載の電気泳動用ポリアクリルアミドゲルの製造方法。

(3) 酸のpK_a値が5以下であることを特徴とする請求項1に記載の電気泳動用ポリアクリルアミドゲルの製造方法。

(4) ゲル緩衝液のpHが4.0～7.5の範囲にあることを特徴とする請求項1に記載の電気泳動

用ポリアクリルアミドゲルの製造方法。

(5) 泳動用電極液中にドデシル硫酸塩が存在することを特徴とする請求項1に記載の電気泳動用ポリアクリルアミドゲルの製造方法。

(6) アクリルアミドを、架橋剤、水、ゲル緩衝液、重合開始手段の存在下に重合させて電気泳動用ポリアクリルアミドゲルを製造するに当たり、該ゲル緩衝液の組成がトリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン、両性電解質及び酸を含有する水溶液であり、トリス（ヒドロキシメチル）アミノメタンと酸の含有量比が1：0.6～1グラム当量部であること並びに酸と両性電解質の含有量比が1：0.5～4グラム当量部であることを特徴とする請求項1に記載の電気泳動用ポリアクリルアミドゲルの製造方法。